家蚕保幼激素结合蛋白*Bmtol*基因的克隆及表达分析

何石宝[1]，杨成飞[1]，尚杉[1]，王凌燕[1]，唐文超[1]，朱勇[1*]

（[1]西南大学生物技术学院，重庆 4007715）

摘要 目的：克隆获得家蚕（*Bombyx mori*）*Bmtol* 基因序列，并对其蛋白结构进行预测，分析其在组织和 JHA 处理后头部的表达差异，为该基因的功能研究提供参考。方法：以家蚕的全组织 cDNA 为模板利用 RT-PCR 技术扩增和克隆获得 *Bmtol* 基因 cDNA 全长序列，并提交至 GenBank 数据库；利用多种生物信息学软件预测分析其编码蛋白的理化特性和结构特征；采用 MREGA5.0 软件中的邻接法（neighbor-joining，NJ）构建 BmTOL 及其它昆虫同源 TO 的进化树；通过 qPCR 技术分析 *Bmtol* 基因在 5 龄 3 天家蚕不同组织的表达情况，及 JHA 处理 5 龄蚕后在 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 家蚕头部的表达情况。结果：克隆获得了家蚕 *Bmtol* 基因的 cDNA 序列（GenBank 登录号 KY681053），*Bmtol* 基因的开放阅读框（ORF）长度为 759 bp，编码 252 个氨基酸，预测其蛋白分子量为 27.72 KD，理论等电点为 6.16，有信号肽，无跨膜结构，且第 25—251 位氨基酸之间存在一个保幼激素结合蛋白家族 JHBP 保守结构域；N 端为疏水区域，可能与保幼激素结合蛋白的核心部位有关。亚细胞定位分析表明，BmTOL 属于分泌型蛋白，主要集中在内质网-高尔基体-质膜分泌途径上。BmTOL 蛋白具有 3 个α螺旋，第 34 位的 Cys 和第 44 位 Cys 形成一个二硫键链接在α1 螺旋和 N 末端，构成 BmTOL 蛋白与配体结合的核心部位。序列比对结果显示，家蚕 BmTOL 序列与其他昆虫 TO 的氨基酸序列一致性差别较大。家蚕 BmTOL 与果蝇 DmTO 的相似性为 25.10%，与烟草烟草天蛾的相似性为 19.69%，与冈比亚按蚊的相似性为 25.78%，与埃及伊蚊的相似性为 23.53%，与黑花蝇的相似性为 28.17%，与意大利蜜蜂的相似性为 23.05%，与苹浅褐卷蛾的相似性为 21.18%。系统进化树分析表明，所有选用昆虫 TO 形成两个大的分支：苹浅褐卷蛾 EpTO1、烟草天蛾 MsTO、意大利蜜蜂 AmTOL、果蝇 DmTO 和黑花蝇 PrTOL 聚为一个分支，埃及伊蚊 AaTO、冈比亚按蚊 AgTOL-2 和家蚕 BmTOL 聚为另一大分支。qPCR 结果显示，*Bmtol* 基因在家蚕头部、表皮和精巢有较高表达，其他组织表达量很低或没有。在 JHA 处理的 5 龄家蚕的头部，*Bmtol* 基因在处理后 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 的表达量差异不明显。结论：BmTOL 蛋白属于 JHBP 家族，具有 JHBP 家族的典型结构；组织表达谱和 JHA 处理结果暗示，BmTOL 属保幼激素结合蛋白（JHBP），在家蚕中除保幼激素结合之外还参与其他多种生理功能。

关键词 家蚕；*Bmtol*；基因克隆；生物信息学分析；JHA

基金项目：国家农业科技成果转化资金项目（2012GB2F100376），油蚕 ov 突变基因的定位克隆研究（Csts2014jcyjA80007）

*通信作者，电子邮箱：zhuy@swu.edu.cn

中图分类号: S882

Cloning and Expression Analysis of Juvenile Hormone Binding Protein Gene *Bmtol* in Silkworm，*Bombyx mori*

HE Shi-Bao[1] , YANG Cheng-Fei[1], Shang Sha[1], Wang Ling-Yan[1], TANG Wen-Chao[1], ZHU Yong[1]

（[1]*Cllege of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715*）

Abstract Objective: The objective of this study is to clone the cDNA sequence of *Bmtol* from silkworm *Bombyx mori*, predict the protein structure, explore its expression profiles in different tissues and at different time of JHA treatment of silkworm, and to provide a fundamental evidence for the future study of the physiological function of this gene. Method: The full-length cDNA sequence of *Bmtol* was cloned from the entire tissues of silkworm by RT-PCR and submitted to the GenBank database. Physiochemical properties and structure characteristics of the deduced amino acid sequence were analyzed by multiple bioinformatics methods. Phylogenetic tree between BmTOL and its homologous JHBP from other insects was constructed using neighbor-joining of MEGA5.0. The expression levels of *Bmtol* mRNA of different tissues at day-3 in 5th instar were detected by qPCR. Result: The full-length cDNA sequence of *Bmtol* was obtained (GenBank is KY681053). The open reading frame (ORF) of *Bmtol* is 759 bp, encoding a protein of 252 aa with an estimated molecular weight of 27.72 kD and pI of 6.16. The encoding protein has a signal peptide and no transmembrance structure, possesses a JHBP superfamily domain between 25-251 residues, exists hydrophobic regions in N-terminus and contains two conserved cysteins, suggesting that it is the core part of the family proteins to bind ligand. Subcellular localization results showed that BmTOL was located on the secretory pathway about endoplasmic reticulum, golgi and plasmalemma which belongs to the secretory protein. BmTOL possesses three α-helixs. The thirty-fourth bit Cys and the forty-fourth bit Cys form a disulfide bond in the α1 helix and the N-terminus, which forms the core part of the BmTOL protein binding to the ligand. The results of amino acid sequence alignment showed that the amino acid sequence of BmTOL of silkworm was significantly different from TO of other insect. It was homologous to DmTO with 25.10% amino acid sequence identity, and had 19.69% sequence identity with MsTO, and had 25.78% sequence identity with AgTOL-2, and had 23.53% sequence identity with AaTO, and had 28.17% sequence identity with PrTOL, and had 23.05% sequence identity with AmTOL, and had 21.18% sequence identity with EpTO1. Phylogenetic analysis revealed that BmTOL, EpTO1, MsTO, AmTOL, DmTO and PrTOL were clustered into one group, AaTO, AgTOL-2 and BmTOL were clustered into the other group. Besides, the results of qPCR showed that the *Bmtol* transcripts were higher expressed in the head, epidermis and testis of the day-3 in 5th instar. The *Bmtol* gene expression was not significantly different in the head at 0 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h in 5th silkworm by JHBP treatment. Conclusion: BmTOL belongs to the JHBP family with a JHBP domain. The results of expression profiling and JHA treatment suggested that

BmTOL belongs to juvenile hormone binding protein (JHBP) and is involved in not only juvenile hormone binding recognition, but also other physiological functions.

Key words *Bombyx mori* ; *Bmtol*; gene cloning; bioinformatics analysis; JHA

家蚕是鳞翅目昆虫的模式生物，又是一种重要的经济昆虫，在我国拥有相当长的驯养历史。家蚕属于完全变态昆虫，其个体发育史分为 4 个阶段，分别为卵、幼虫、蛹、成虫，是完全受到环境与神经内分泌的调节控制影响，从幼虫到成虫的生长、发育等过程主要受保幼激素（Juvenile hormone， JH）和蜕皮激素（20-hydroxyecdysone，20E）协同调控[1]。在昆虫中，TO/JHBP 蛋白主要负责 JH 在体内的运输、阻止 JH 的降解等[2-4]。此外，TO/JHBP 蛋白还参与调控昆虫摄食与运动[5,6]、节律调控[7-11]、味觉和嗅觉系统的化学感受[12]、性别分化和求偶行为[5,13-15]等。因此，研究家蚕 *Bmtol* 基因为蚕业生产具有重要的应用价值。Sarov-Blat 等[7]最先在果蝇（*Drosophila melanogaster*）中鉴定并将其命名为 DmTO。在蜜蜂、飞蛾等昆虫中也发现了大量 TO/JHBP 蛋白家族成员[16]。Hamiaux 等[17]利用硫的单波长反常衍射(sulfur-single wavelength anomalous diffraction， S-SAD)技术首次报道了雄性苹浅褐卷蛾（*Epiphyas postvittana*）中 EpTO1 的晶体结构，该结构包含 4 个α螺旋和 5 个β折叠，由疏水氨基酸构成的桶状结构，并在中间形成一通道；在桶状结构的顶部位置，Cys8 和 Cys15 形成一个二硫键，连接于 N 末端和α1 螺旋的第一个弯曲，并认为该部位是 TO 蛋白与配体结合的核心部位。利用硒代蛋氨酸的单波长反常衍射对家蚕的一个 JHBP 蛋白的结构进行了分析，发现含有 3 个α螺旋和 5 个β折叠，α1 螺旋参与形成 JH 结合的口袋，即与配体结合的核心部位[18]。在果蝇的研究中发现 *to* 基因是一个新的生物钟调控输出基因[9]，此外还发现了一个新这类基因与果蝇取食行为的节律调控有关[8]。*Dmto* 编码了一种类似于 JHBP 的 TO 蛋白，通过它可以提高果蝇饥饿时味觉系统对糖分的敏感性，从而增加取食量，进而调节果蝇体内的营养平衡[19]。Dauwalder 等[5]研究中发现 TO/JHBP 蛋白通过对性别信号进行加工整合，进而影响雄性的求偶行为。在研究果蝇寿命方面发现，如果 TO 的表达量增多，会延长果蝇的寿命[20]。在烟草天蛾（*Manduca sexta*）中，TO/JHBP 蛋白家族可以维持表皮细胞中 JH 的含量，受到 JH 和营养状况的调控[21]。在研究冈比亚按蚊（*Anopheles gambiae*）时发现 Takeout-like 蛋白主要触角中表达[22]。Bohbot 等[12]在埃及伊蚊（*Aedes aegypti*）的触角中发现 TO 蛋白高量表达，可推测 TO 蛋白对宿主、食物或信息素气味分子的化学感应。在黑花蝇（*Phormia regina*）中通过免疫组织化学实验表明 TOL 蛋白主要分布于辅助细胞的细胞膜周围和唇瓣味觉感受器的淋巴液中，这表明了 TOL 蛋白也可能对昆虫的感受系统有调控作用[23]。Hagai 等[7]在意大利蜜蜂（*Apis mellifera*）的研究中发现 TO 蛋白的表达受到发育相关因子 JH 调控。根据其他昆虫 TO/JHBP 蛋白家族的研究，研究家蚕 *Bmtol* 基因有利于推动其在蚕桑产业上的研究。通过 SilkDB 和 NCBI 数据库的筛选，克隆得到家蚕的一个 *Bmtol* 基因，并对其蛋白结构特征进行预测，利用 qPCR 进一步对组织表达情况和 JHA

（Juvenile hormone analogue）处理后头部表达情况进行分析，将为该蛋白的深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

试验于 2015 年 5-12 月在西南大学生物技术学院完成。

1.1 供试材料

试验用的家蚕品种为大造品种，由西南大学生物技术学院家蚕遗传育种实验室保存。在 5 龄 3 天取家蚕各组织的材料，-80℃保存。并对 5 龄起蚕添食 JHA 浸泡的新鲜桑叶处理，对照组为丙酮，每天添食一次处理的桑叶，其它时间为正常桑叶饲养，连续处理三天后开始取材，分别取 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 家蚕头部组织，-80℃保存。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

按照 RNAiso Plus 试剂（Takara）盒说明书对家蚕各组织样本提取总 RNA，并对其进行浓度和纯度测定，根据 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（Takara）反转录合成 cDNA 第一链，并进行内参基因 *BmActin3* 检测，-20℃保存备用或直接进行下一步试验。其中，5 龄 3 天的不同组织和 JHA 处理不同时间头部的 cDNA 模板用于 RT-PCR 和 qPCR 反应；整只家蚕全组织 cDNA 模板用于目的基因的克隆。

1.3 引物设计

通过 SilkDB 和 NCBI 数据库得到目的基因片段。使用 Primer Premier 5.0 软件设计 *Bmtol* 基因的引物。根据克隆得到的序列预测该基因的 ORF，并在设计荧光定量 PCR 引物。选择家蚕肌动蛋白 *BmActin3* 和 *sw22934* 为内参基因。引物信息详见表 1。所用引物有南京金斯瑞合成。

表 1 本研究所用引物

Table1 Primers used in this study

Gene name	Primers sequences（5’-3’）	Using
Bmtol	F:CTGTTTACTACAAGGGAACACG R: TTCATTCGCCTTTAAACATTTT	Clone
Bmtol	F: CGGGGGCTGGTGATTTTCAT R: GACCAAGATCTGAGTGTCCAACT	qPCR
BmActin3	F:AACACCCCGTCCTGCTCACTG R:GGGCGAGACGTGTGATTTCCT	Reference
sw22934	F: TTCGTACTGGCTCTTCTCGT R: CAAAGTTGATAGCAATTCCCT	qPCR Reference

1.4 家蚕 *Bmtol* 基因的克隆

以家蚕全组织 cDNA 为模板，按照如下体系进行 PCR 扩增：

试剂	使用量（μL）
cDNA 模板	1

10xloading buffer	2.5
Mg^{2+}（2.5 mM）	2
dNTPs(2.5 mM each)	2
正向引物	0.75
方向引物	0.75
EXTaq 酶	0.25
ddH_2O	补至 25

按照如下 PCR 程序进行扩增：95℃预变性 4 min，94℃变性 35 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 40 s，反应 30 个循环，再在 72℃进行终延伸 10 min，4℃保存。取样 5 μL 用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测，经染色后观察后并保存实验数据。，将目的片段进行切胶，并根据 TIANGEN 琼脂糖胶回收试剂盒使用说明进行 DNA 回收，将回收产物连接到 pMD^{TM}19-T 克隆载体，转化至 DH5α感受态细胞，经蓝白斑筛选鉴定，挑取单一白色菌落至含 Amp（1：1000）的 LB 液体培养基中扩大培养。经菌液 PCR 鉴定，将阳性克隆产物 100-200μL 送华大基因进行测序。

1.5 家蚕 *Bmtol* 基因生物信息学分析

将测序所得序列在 NCBI 中用 Blastn（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）工具进行核酸序列的同源性分析，利用在线软件 ORF Finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html）查找序列的开放阅读框，使用 BioXM2.6 软件预测其编码的氨基酸序列。SignalP 4.1（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测信号肽序列；蛋白二级结构预测：SOPMA 软件（https://npsa-prabi.ibcp.fr/）。三级结构预测：SWISS-MODEL 软件（https://swissmodel.expasy.org/）；ProtParam（http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam）预测蛋白的分子量、等电点等理化性质；利用 TargetP 1.1 Server 软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/）进行亚细胞定位；ProtScale（http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl）进行疏水性分析；TMHMM-2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）分析跨膜结构；利用 NetNGlyc 1.0 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/）进行糖基化位点分析；运用在线工具 NCBI Conserved Domains（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）分析保守结构域；SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）分析功能结构域；PredictProtein（https://www.predictprotein.org/）预测氨基酸序列中二硫键的位置。利用 DNAMAN 软件进行氨基酸的多序列比对，采用 MEGA5.0 软件中的邻接法（neighbor-joining，NJ）构建系统发育树。

1.6 qPCR 检测

qPCR 反应的体系如下：

试剂	使用量μL
cDNA 模板	2 μL
SYBR Green Mix	15 μL

正向引物	0.75 μL
方向引物	0.75 μL
ddH_2O	补至 25 μL

qPCR 反应程序：95℃预变性 6 min，95℃变性 15 s，59℃退火 30 s 反应 40 个循环，95℃ 15 s，59℃ 20 s，95℃ 10 s。所有样品重复三次。

1.7 数据分析

qPCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行处理分析。采用 SPSS19.0 软件中的 ANOVA 法进行单因素方差分析。所得结果均以平均数±标准误（mean±SE）表示，并利用 excel 进行图形分析，P＜0.05 表示差异显著，P＜0.01 表示差异极显著。

2 结果

2.1 家蚕 *Bmtol* 基因克隆与序列分析

以大造 5 龄 3 天表皮组织的 cDNA 为模板，对 *Bmtol* 基因进行进行 PCR 扩增，获得 *Bmtol* 基因的序列片段（图 1）。并对该特异性 PCR 产物进行胶回收，克隆获得菌液 PCR 阳性结果，送华大基因测序，结果表明该片段为 810 bp。序列已提 GenBank（审核中）。

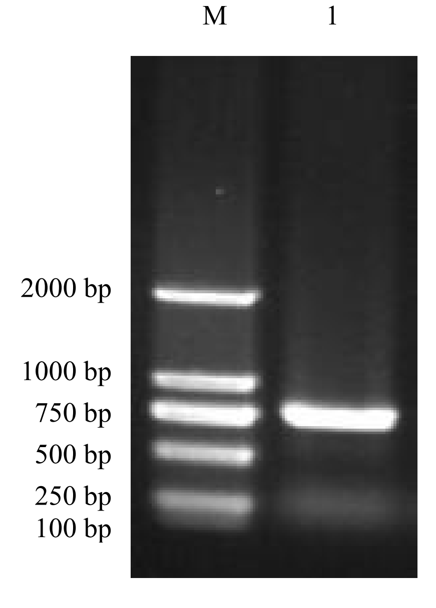


图 1 *Bmtol* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *Bmtol* gene

M: DL2000 DNA marker; 1: PCR amplification of *Bmtol* gene

利用 ORF Finder 对所获的序列进行分析表明，*Bmtol* 基因的 cDNA 含有 25 bp 的 5’非编码区、759 bp 的完整 ORF 和 26 bp 的 3’非编码区，共编码 252 个氨基酸（图 2）。BmTOL 蛋白的分子量大小为 27.72KD，理论等电点为 6.16。亲疏水性预测总平均疏水值总平均疏水值（总平均疏水值）为-0.028，故判断该蛋白为亲水性蛋白。并在 N 端含有两个保守的 Cys，C 端有一个糖基化位点（图 2）。

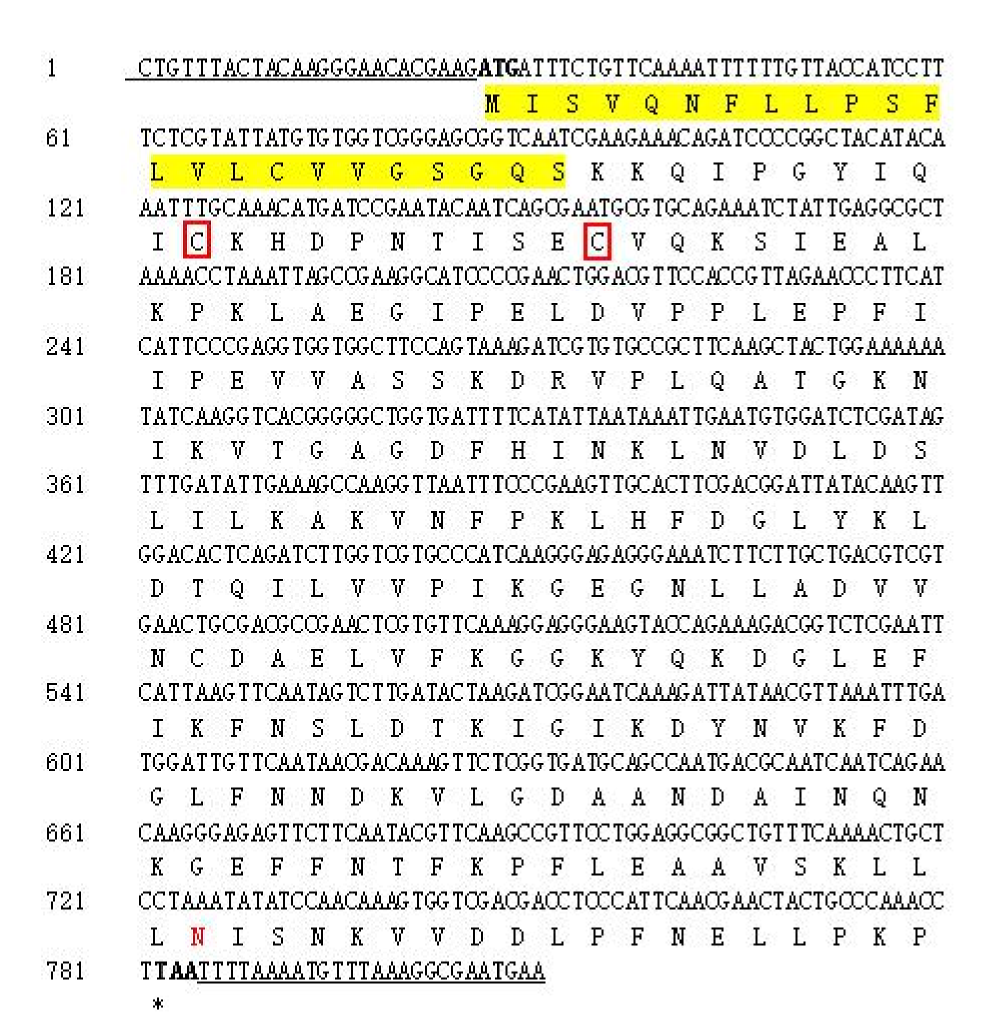


图 2 *Bmtol* 基因 cDNA 核苷酸序列及蛋白序列

Fig.2 Nucleotide and amino acid sequences of *Bmtol* cDNA

Non-coding region was showed by lowercase letters, ORF was showed by non-underlined, the start and stop codons were indicated by bold, signal peptide was yellow region, conversed Cys residues were boxed in red, Glycosylated residues was red print.

2.2 家蚕 BmTOL 蛋白结构预测

在线 NCBI 结构域分析结果表明，*Bmtol* 基因编码的第 25-251 为氨基酸之间为保幼激素结合蛋白家族的保守结构域 JHBP（图 3）。BmTOL 蛋白的信号肽位于 1-23 位氨基酸（图 4），无跨膜区（图 5），二级结构预测发现该蛋白包含有α螺旋（占 30.16%），β折叠（占 10.32%），无规卷曲（占 36.51%），延伸片段（占 23.02%）（图 6）。疏水性分析显示，BmTOL 的氨基酸序列中，第 165 位氨基酸 Score 值最低为-2.356，第 15 位和第 16 位氨基酸最高为 2.700，平均疏水性为-0.028，说明该蛋白为亲水性蛋白。亚细胞定位结果表明，BmTOL 蛋白可能存在于细胞外（91.1%）、线粒体（4.1%）和其他位置（6.1%）中，主要集中在分泌途径上，说明该蛋白属于分泌型蛋白。其三级结构如图 7。

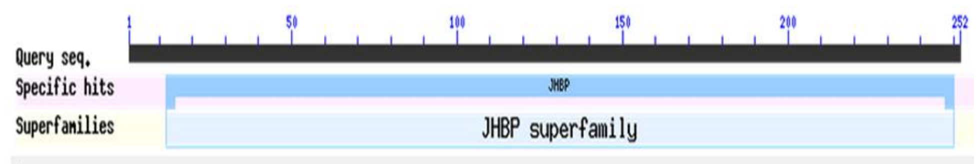


图 3 BmTOL 蛋白的结构域位置

Fig.3 The domain position of BmTOL protein

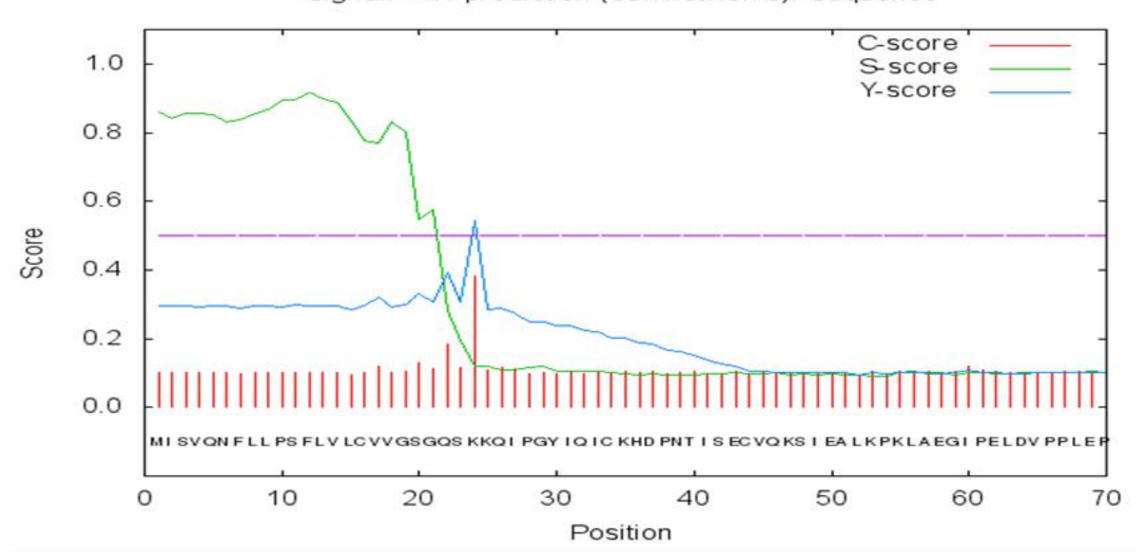


图 4 家蚕 BmTOL 信号肽预测

Fig.4 Prediction of signal peptides of BmTOL in Silkworm

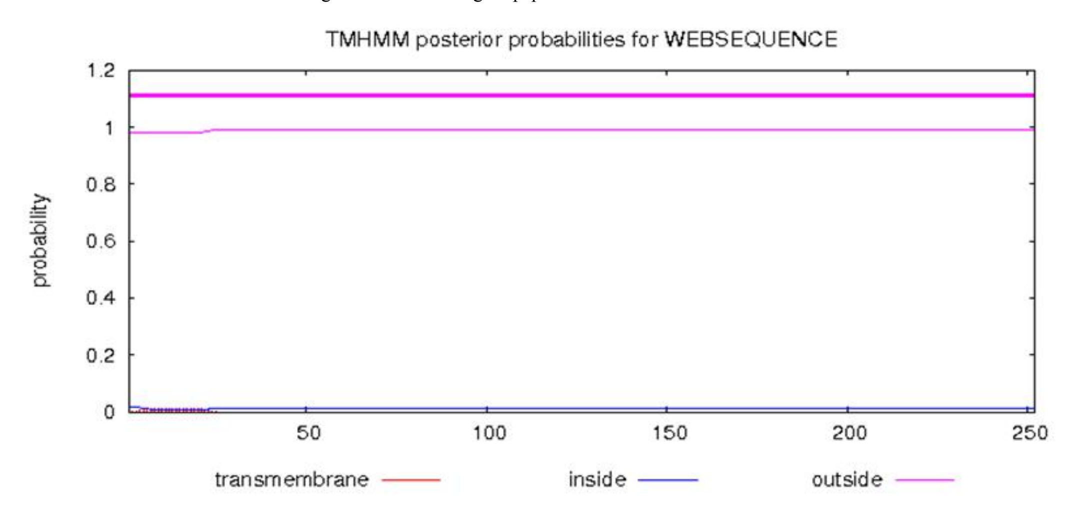


图 5 BmTOL 跨膜区预测

Fig.5 The result of predicted graphical of BmTOL transmembrane region

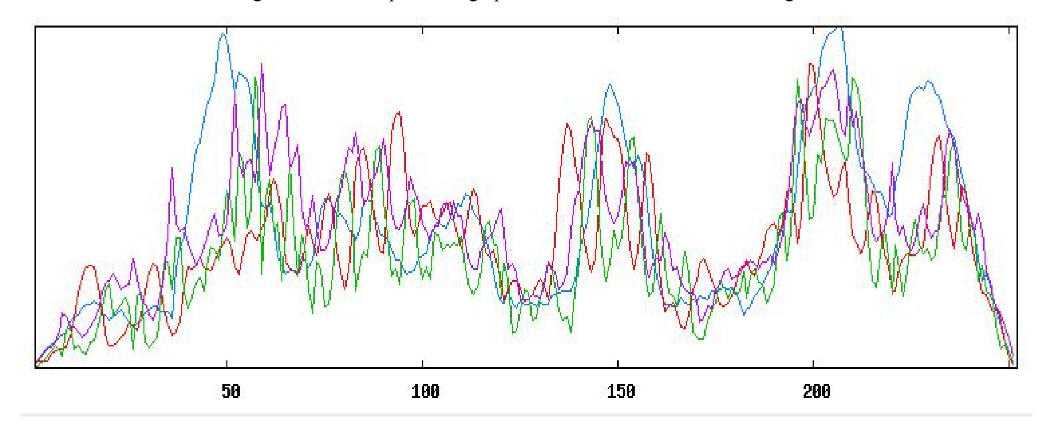


图 6 家蚕 BmTOL 二级结构预测

Fig.6 Prediction of the secondary structure of BmTOL in Silkworm

Blue lines represent α helix; Green lines represent β sheet; Purple lines represent Random coil ; Red lines represent Extended strand.

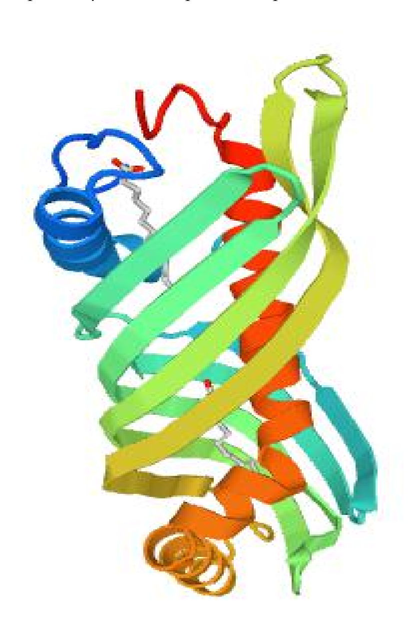


图 7 家蚕 BmTOL 蛋白三级结构预测

Fig. 7 Prediction of tertiary structure of BmTOL protein

2.3 家蚕 BmTOL 序列比对和进化树分析

将克隆所得序列蛋白序列其他昆虫的氨基酸序列进行序列比对。序列比对结果显示，家蚕 BmTOL 序列与其他昆虫 TO 的氨基酸序列一致性差别较大（图 8）。家蚕 BmTOL 与果蝇的相似性为 25.10%，与烟草烟草天蛾的相似性为 19.69%，与冈比亚按蚊的相似性为 25.78%，与埃及伊蚊的相似性为 23.53%，与黑花蝇的相似性为 28.17%，与意大利蜜蜂的相似性为 23.05%，与苹浅褐卷蛾的相似性为 21.18%。与不同昆虫之间的的相似性均较低，这可能与该家族蛋白在昆虫体内发挥不同的功能有关。使用 MEGA5.0 软件邻接法进行 1000 次重复计算后构建系统进化树（图 9）。由图 9 可以看出，所有选用昆虫 TO 形成两个大的分支：苹浅褐卷蛾 EpTO1（ACF39401.1）、烟草天蛾 MsTO（AAO65575.1）、意大利蜜蜂 AmTOL（NP_001011640.1）、果蝇 DmTO（AAF79960.1）和黑花蝇 PrTOL（BAD83405.1）聚为一个分支，埃及伊蚊 AaTO（AAL60239.1）、冈比亚按蚊 AgTOL-2（AAO39756.1）和家蚕 BmTOL 聚为另一大分支，其中与冈比亚按蚊的亲缘关系最近。

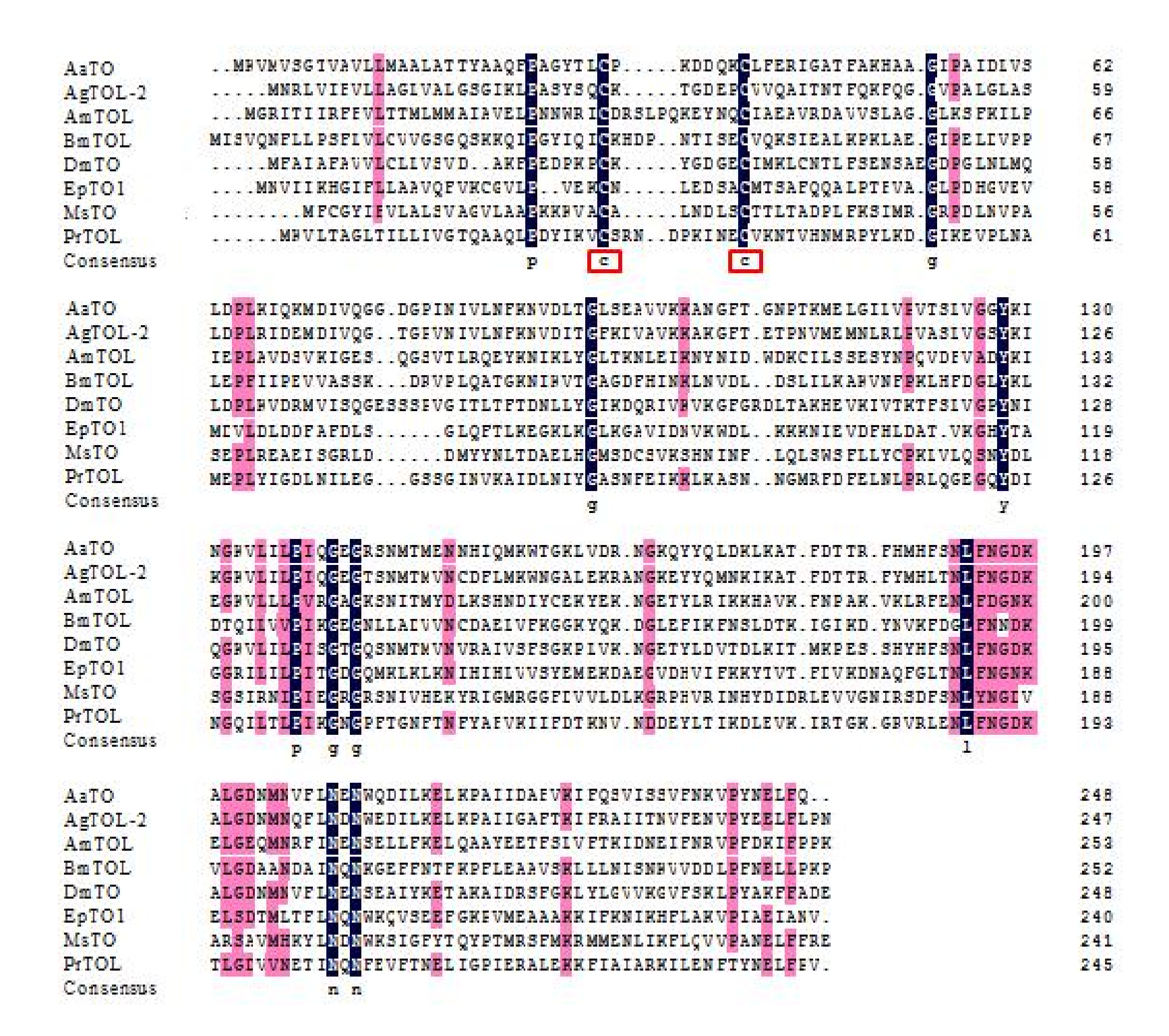


图 8 昆虫 T0 蛋白多序列比对结果

Fig.8 Multiple sequence slignment results of T0 proteins in insects

Conversed cysteine residues were boxed in red. The identity of black part are equal to 100% and the identity of red part are greater than 75%.

64
43
41
33
81
Epiphyas postvittana（ACF39401.1）
Manduca sexta（AAO65575.1）
Apis mellifera（NP_001011640.1）
Drosophila melanogaster（AAF79960.1）
Phormia regina（BAD83405.1）
Aedes aegypti（AAL60239.1）
BmTOL
Anopheles gambiae（AAO39756.1）

图 9 基于氨基酸序列构建的昆虫 TO 的系统发育树

Fig. 9 Phylogenetic tree of TO reconstructed from insects based on amino acid sequence

2.4 家蚕 *Bmtol* 基因组织表达分析

以 5 龄 3 天家蚕各组织的 cDNA 为模板，通过 qPCR 技术分析发现，*Bmtol* 基因在家蚕的不同组织中表达存在差异（图 10）。由图 10 可以看出，*Bmtol* 基因

在家蚕的头部表达了最高，其次是在表皮和精巢中，均极显著高于其他组织（p<0.01）而其他组织表达量很低。

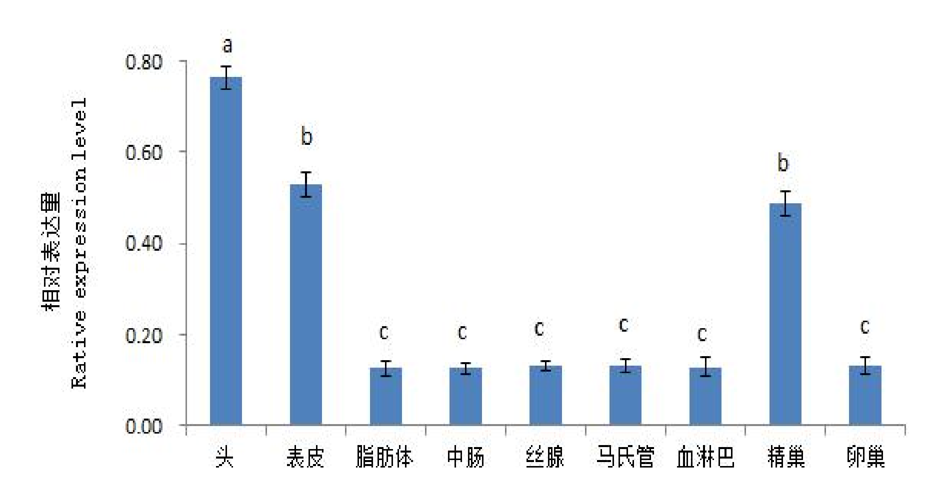


图 10 qPCR 分析家蚕 *Bmtol* 基因 5 龄 3 天组织的表达量

Fig.10 qPCR analysis of *Bmtol* gene expression in various tissues of 3 day in 5th instar silkworm larvae

The different letter indicated extremely significant difference (P＜0.01)

2.5 JHA 处理后 *Bmtol* 基因在头部的表达特征

以 JHA 处理的家蚕头部各时间的 cDNA 为模板，通过 qPCR 技术分析发现，*Bmtol* 基因在 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 的头部中表达差异不明显（图 11）。由图 11 可以看出，*Bmtol* 基因在 JHA 处理组的表达量要高于丙酮处理组，但其差异不显著，且在处理后不同时间差异也不显著。

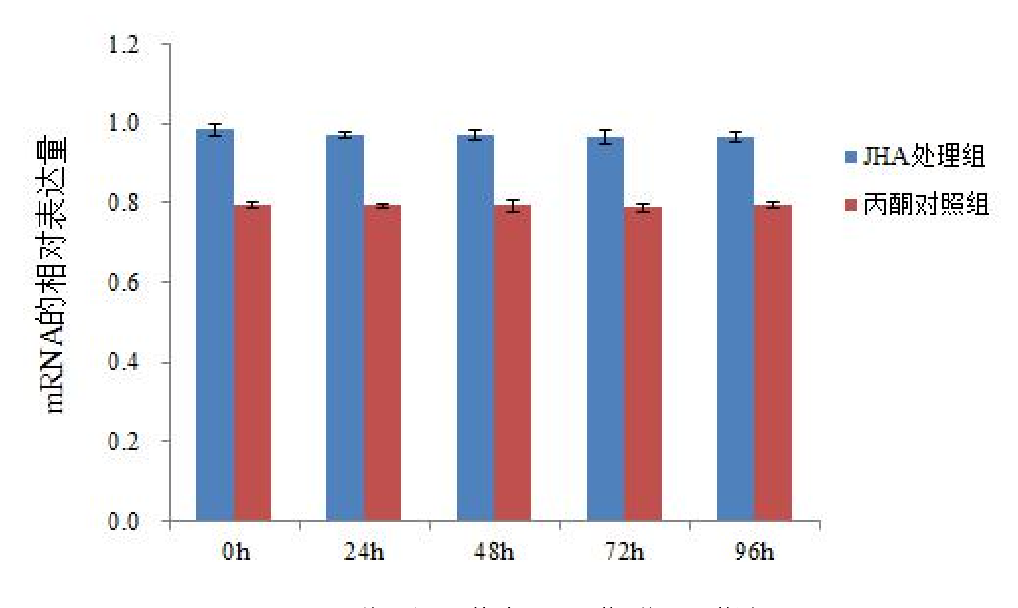


图 11 JHA 处理后不同时间家蚕 *Bmtol* 基因的 qPCR 检测

Fig.11 The qPCR analysis of *Bmtol* expression after treatment of JHA for different time

3 讨论

保幼激素结合蛋白在昆虫体内对保幼激素的转运和功能的发挥具有重要意义[2-4,24-28]。在研究中，我们通过在线数据库 SilkDB 和 NCBI 数据库获得家蚕 *Bmtol*

基因的预测序列，并利用 PCR 方法成功扩增出 *Bmtol* 基因的 cDNA 序列，ORF 的长为 759 bp，编码 252 个氨基酸，预测分子量大小为 27.72KD，等电点为 6.16，序列中含有两个保守的 Cys 位点，在 N 末端和α1 螺旋之间形成一个二硫键，构成该蛋白与配体结合的核心结构。并在 N 端含有一段 23 个氨基酸序列的信号肽，且含有一个保守的 JHBP 结构域，与报道的其他昆虫这类蛋白的结构特征基本类似。

几乎所有的分泌蛋白都具有信号肽，信号肽是检测蛋白质是否为分泌蛋白的一个重要指标[29,30]。BmTOL 蛋白的 N 末端有一段 23 个氨基酸序列的信号肽，并且其疏水性预测分析发现该蛋白为亲水性蛋白，这说明 BmTOL 蛋白可能是分泌蛋白。通过亚细胞定位软件 TargetP 1.1 Server 预测结果显示 BmTOL 蛋白主要是以胞外形式存在，故与上述推断一致。

本研究通过 qPCR 技术分析，发现 *Bmtol* 基因主要在家蚕的头部、表皮和精巢中表达量较高，而其他组织中表达量较低或没有。Sarov-Blat 等[7]利用原位杂交技术发现 *to* 基因主要在果蝇的前胃和嗉囊中有高量表达，在脑和触角中也有表达。Du 等[21]通过原位杂交发现在烟草天蛾（*Manduca sexta*）5 龄第 2 天的幼虫的头部、胸及腹部的表皮中表达，而其它组织中均没有被检测到。Justice 等[22]在研究冈比亚按蚊（*Anopheles gambiae*）是发现 TOL 蛋白主要触角中表达。Bohbot 和 Vogt 在埃及伊蚊（*Aedes aegypti*）雄性的触角分离出 *to* 基因[12]。Fujikawa 等通过蛋白印迹[23]发现 TOL 蛋白在黑花蝇（*Phormia regina*）的触角和下唇须中高表达，而在其它组织中没有检测到。Saito 等[31]在家蚕（*Bombyx mori*）中发现 JHBP 蛋白主要在触角、中肠、脂肪体和丝腺中表达。Hagai 等[6]在意大利蜜蜂（*Apis mellifera*）腹部和头部检测到有表达，而在其它组织中没有检测到。可能与蛋白家族主要参与摄食与运动[5,6]、节律调控[7-11]、味觉和嗅觉系统的化学感受[12]、性别分化和求偶行为[5,13-15]等有关。

为研究 *Bmtol* 基因受 JH 调控的影响，本研究通过对 5 龄起蚕添食 JHA 处理的桑叶，然后对处理后不同时间 *Bmtol* 基因在头部的表达情况，发现实验组与对照组差异不明显，而且随处理后时间的变化也没有太大的变化，说明 *Bmtol* 基因受 JH 调控影响很少或不明显，也许该基因在其他调控方面发挥重要作用。对 *Bmtol* 基因在家蚕体内的主要功能研究还需要进一步深入。

4 结论

成功克隆了家蚕保幼激素结合蛋白基因 *Bmtol* 的序列。序列分析表明，*Bmtol* 具有 JHBP 家族的典型结构，与冈比亚按蚊的亲缘关系最近。组织表达结果显示，*Bmtol* 在不头、表皮和精巢中有较高的表达量，其他组织中表达量极低或没有。暗示着该基因可能涉及更广泛的生理机制的调控。

References

[1] Whisenton LR, Bowen MF, Granger NA, et al. Brain-mediated 20-hydroxyecdysone regulation of juvenile hormone synthesis by the

corpora allata of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Gene and Comp Endoc, 1985, 58(2):311-318.

[2] Orth AP, Lan Q, Goodman WG. Ligand regulation of juvenile hormone binding protein mRNA in mutant *Manduca sexta*. Mol Cell Endocrinol, 1999, 149(1-2): 61-69.

[3] Orth AP, Tauchman S J, Doll SC, et al. Embryonic expression of juvenile hormone binding protein and its relationship to the toxic effects of juvenile hormone in *Manduca sexta*. Insect Biochem Molec, 2003, 33(12): 1275-1284.

[4] 贺秀婷, 张亚楠, 李飞，等. 灰飞虱保幼激素结合蛋白基因的克隆及表达动态. 南京农业大学学报, 2012, 35(2): 59-64.

He XT, Zhang YN, Li F, et al. Cloning, temporal expression of a *juvenile hormone binding protein* gene in *Laodelphax striatellus*(Fallén). Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 35(2): 59-64.(in Chinese)

[5] Dauwalder B, Tsujimoto S, Moss J, et al. The *Drosophila takeout* gene is regulated by the somatic sex-determination pathway and affects male courtship behavior. Gene Dev, 2002, 16(22): 2879-2892.

[6] Hagai T, Cohen M, Bloch G. Genes encoding putative takeout/juvenile hormone binding proteins in the honeybee(*Apis mellifera*) and modulation by age and juvenile hormone of the *takeout-like* gene *GB19811*. Insect Biochem Molec, 2007, 37(37): 689-701.

[7] Sarov-Blat L, So WV, Liu L, et al. The *Drosophila takeout* gene is a novel molecular link between circadian rhythms and feeding behavior. Cell, 2000, 101(6): 647-656.

[8] So WV, Sarov-Blat L, Kotarski CK, et al. *takeout*, a novel *Drosophila* gene under circadian clock transcriptional regulation. Mol Cell Biol, 2000, 20(18): 6935-6944.

[9] Gáliková M, Flatt T. Dietary restriction and other lifespan extending pathways converge at the activation of the downstream effector *takeout*. Aging, 2010, 2(7): 387-389.

[10] Benito J, Hoxha V, Lama C, et al. The circadian output gene *takeout* is regulated by *Pdp1ε*. P Natl Acad Sci USA, 2010, 107(6): 2544-2549.

[11] Khericha M, Kolenchery JB, Tauber E. Neural and non-neural contributions to sexual dimorphism of mid-day sleep in *Drosophila melanogaster*: a pilot study. Physiol Entomol, 2016, 41(4): 327-334.

[12] Bohbot J, Vogt RG. Antennal expressed genes of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti* L.) characterization of odorant-binding protein 10 and takeout. Insect Biochem Molec, 2005, 35(9): 961-979.

[13] Kaneko Y, Hiruma K. Allatotropin inhibits juvenile hormone biosynthesis by the corpora allata of adult *Bombyx mori*. J Insect Physiol, 2015, 80: 15-21.

[14] Vanaphan N, Dauwalder B, Zufall RA. Diversification of *takeout*, a male-biased gene family in *Drosophila*. Gene, 2012, 491(2): 142-148.

[15] Wei D, Li HM, Tian CB, et al. Proteome analysis of male accessory gland secretions in oriental fruit flies reveals juvenile hormone-binding protein, suggesting impact on female reproduction. Sci Rep-UK, 2015, 5: 16845.

[16] 于芹, 安利国, 王宪辉. 昆虫 Takeout 蛋白家族的研究进展. 应用昆虫学报, 2011, 48(2): 404-409. (in Chinese)

Yu Q, An LG, Wang XH. Recent advances in Takeout protein family of insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2011, 48(2): 404-409.

[17] Hamiaux C, Stanley D, Greenwood DR, et al. Crystal structure of Epiphyas postvittana takeout1 with bound ubiquinone supports a

role as ligand carriers for takeout proteins in insects. J Biol Chem, 2009, 284(6): 3496-3503.

[18] Fujimoto Z, Suzuki R, Shiotsuki T, et al. Crystal structure of silkworm *Bombyx mori* JHBP in complex with 2-methyl-2,4-pentanediol: plasticity of JH-binding pocket and ligand-induced conformational change of the second cavity in JHBP. PLoS One, 2013, 8(2):e56261.

[19] Meunier N, Belgacem YH, Martin JR,. Regulation of feeding behaviour and locomotor activity by *takeout* in *Drosophila*. J Exp Biol, 2007, 210(Pt 8): 1424–1434.

[20] Bauer J, Antosh M, Chang C, et al. Comparative tranciptional profiling identifies *takeout* as a gene that regulates life span. Aging, 2010, 2(5): 298-310.

[21] Du J, Hiruma K, Riddiford LM. A novel gene in the *takeout* gene family is regulated by hormones and nutrients in *Manduca* larval epidermis. Insect Biochem Molec, 2003, 33(8): 803-814.

[22] Justice RW, Dimitratos S, Walter MF, et al. Sexual dimorphic expression of putative antennal carrier protein genes in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol, 2003, 12(6): 581-594.

[23] Chang ES, Coudron TA, Bruce MJ, et al. Juvenile hormone-binding protein from the cytosol of *Drosophila* Kc cells. P Natl Acad Sci USA, 1980, 77(8): 4657-4661.

[24] Shemshedini L, Lanoue M, Wilson T G. Evidence for a juvenile hormone receptor involved in protein synthesis in *Drosophila melanogaster*. J Biol Chem, 1990, 265(4): 1913-1918.

[25] Chang ES, Bruce MJ, Prestwich GD. Further characterization of the juvenile hormone-binding protein from the cytosol of a *Drosophila* cell line: use of a photoaffinity label. Insect Biochem, 1985, 15(2): 197-204.

[26] Ashok M, Turner C, Wilson TG. Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. P Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6): 2761-2766.

[27] Wilson TG, Yerushalmi Y, Donnell DM, et al. Interaction between hormonal signaling pathways in *Drosophila melanogaster* as revealed by genetic interaction between Methoprene-tolerant and Broad-Complex. Gene, 2006, 172(1): 253-264.

[28] 赵亚华. 基础分子生物学教程. 2 版. 北京: 科学出版社, 2006: 351-355.

Zhao Y H. Fundamental Molecular Biology Course. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2006: 351-355. (in Chinese)

[29] 彭佳师, 龚继明. 信号肽与蛋白质的分选转运. 植物生理学报, 2011, 47(1): 9-17.

Peng JS, Gong JM. The mechanisms of protein sorting and translocation regulated by signal peptides. Plant Physiology Journal, 2011, 47(1): 9-17. (in Chinese)

[30] Fujikawa K, Seno K, Ozaki M. A novel Takeout-like protein expressed in the taste and olfactory organs of the blowfly, *Phormia regina*. Febs J, 2006, 273(18): 4311-4321.

[31] Saito K, Su ZH, Emi A, et al. Cloning and expression analysis of *takeout/JHBP* family genes of silkworm, *Bombyx mori*. Insect Mol Biol, 2006, 15(3): 245-251.